

0418118-TLD

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-337036

(43)Date of publication of application : 07.12.2001

(51)Int.Cl.

G01N 21/27
G01N 33/543
H01L 31/12

(21)Application number : 2000-154614

(71)Applicant : KARUBE MASAO
AKIMOTO TAKAHISA

(22)Date of filing : 25.05.2000

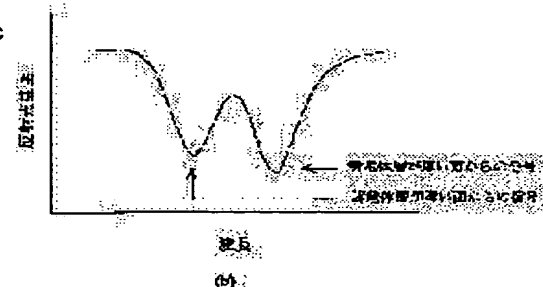
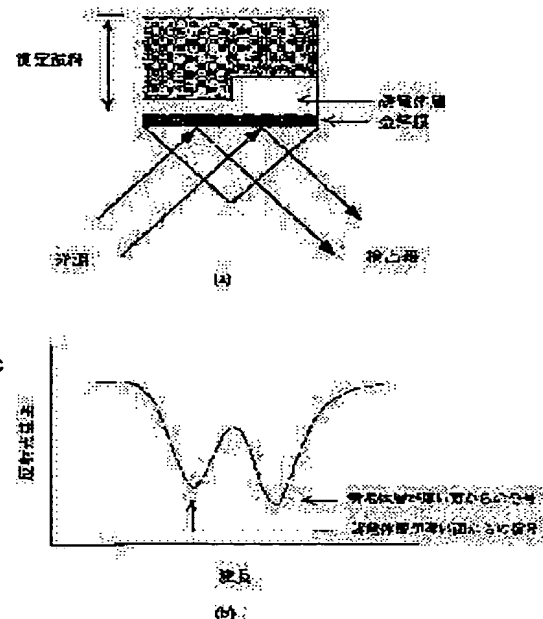
(72)Inventor : KARUBE MASAO
AKIMOTO TAKAHISA

(54) DIFFERENTIAL SPR SENSOR AND MEASURING METHOD USING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a differential SPR sensor capable of independently determining a resonance wavelength and not requiring the determination of a base line.

SOLUTION: In the differential SPR sensor wherein a surface on which a substance to be measured is fixed and a surface on which no substance to be measured is fixed are formed on a metal film, a plurality of dielectric films different in thickness are formed on the metal film, and the surface of one dielectric film is set to a reference surface and the surface of the other dielectric film is set to an operation surface to fix the substance to be measured.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-337036

(P2001-337036A)

(43) 公開日 平成13年12月7日 (2001.12.7)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
G 0 1 N 21/27		G 0 1 N 21/27	C 2 G 0 5 9
33/543	5 9 5	33/543	5 9 5 5 F 0 8 9
H 0 1 L 31/12		H 0 1 L 31/12	E

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2000-154614(P2000-154614)

(22) 出願日 平成12年5月25日 (2000.5.25)

(71) 出願人 591086706
軽部 征夫
神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地
16

(71) 出願人 500240759
秋元 卓央
東京都新宿区西落合3-24-20

(72) 発明者 軽部 征夫
神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地
16

(74) 代理人 100103137
弁理士 稲葉 滋

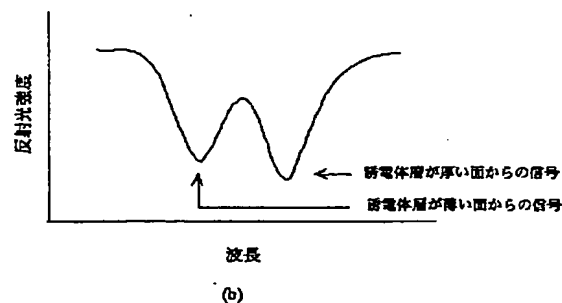
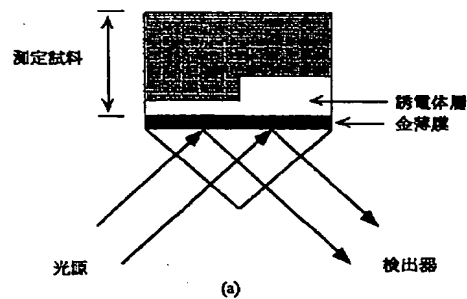
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 差動式SPRセンサー及び該センサーを用いた測定法

(57) 【要約】

【課題】 共鳴波長を独立に決定することができ、ベースラインの決定を必要としない差動式SPRセンサーを提供する。

【解決手段】 金属膜上に被測定物質を固定化した面と固定化していない面とを形成してなる差動式SPRセンサーであって、該金属膜に膜厚の異なる誘電体膜を複数形成し、一つの誘電体膜の表面を参照面とし、他の誘電体膜の表面を動作面として被測定物質を固定化するように構成した。



【特許請求の範囲】

【請求項1】金属膜上に被測定物質を固定化した面と固定化していない面とを形成してなる差動式SPRセンサーであって、該金属膜に膜厚の異なる誘電体膜を複数形成し、一つの誘電体膜の表面を参照面とし、他の誘電体膜の表面を動作面として被測定物質を固定化するように構成したことを特徴とする差動式SPRセンサー。

【請求項2】請求項1において、前記センサーはプローブ型SPRセンサーであり、プローブのセンサー面を形成する金属膜に動作面と参照面とを形成してなることを特徴とする差動式SPRセンサー。

【請求項3】請求項2において、前記センサーは、光源と、センサープローブと、光検出手段とを有し、該プローブはセンサー面を備えた金属膜と、反射面とを有しており、該プローブの基端側は光の入出端部を構成しており、該光源は該プローブの基端側に光学的に連結されており、該光検出手段は該金属膜及び該反射面を介して該プローブの基端側から出射された光を受光するように構成されていることを特徴とする差動式プローブ型SPRセンサー。

【請求項4】請求項3において、前記金属膜及び反射面はプローブの先端側に形成してあることを特徴とする差動式プローブ型SPRセンサー。

【請求項5】請求項4において、センサー面に対する光の入射角は60度から80度の間であることを特徴とする差動式プローブ型SPRセンサー。

【請求項6】請求項5、6いずれかにおいて、該センサー面と該反射面とはプローブの長さ方向に対して傾斜状に延出する傾斜面に形成されていると共に、互いに直角に会合するように構成されていることを特徴とする差動式プローブ型SPRセンサー。

【請求項7】金属膜上に被測定物質を固定化した面と固定化していない面とを形成してなる差動式SPRセンサーであって、該金属膜に膜厚の異なる誘電体膜を複数形成し、一つの誘電体膜の表面を参照面とし、他の誘電体膜の表面を動作面として被測定物質を固定化してなる差動式SPRセンサーを用いた測定法であって、該動作面における測定結果と該参照面における測定結果とを比較することで測定物質を測定することを特徴とする差動式SPRセンサーを用いた測定法。

【請求項8】請求項7において、該センサーはプローブ型センサーであり、該動作面における共鳴波長と該参照面における共鳴波長とを比較することを特徴とする差動式SPRセンサーを用いた測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、表面プラズモン共鳴（SPR）を利用したSPRセンサーに係り、詳しくは差動式SPRセンサーに関するものである。本発明に係るSPRセンサーは好適にはプローブ型センサーとし

て具現化され、好ましくは、バイオセンサーとして用いられる。

【0002】

【従来の技術】SPRセンサーは一般に図1（a）に示す構造を有する。表面プラズモン（Surface Plasmon: SP）は金属と試料の誘電率によって決定される。このSPの波数ベクトルは光を入射することで励起することができ、一般的なSPRセンサーでは、図中のプリズム側から光を入射することでSPの励起を行う。

【0003】図1（a）の配置を用い、また光源として白色光線を用いた場合に得られる結果は図1（b）に示す通りであり、ある波長において極小値を得ることができる。本明細書ではこれを共鳴波長と呼ぶ。この共鳴波長が前述のSPの波数ベクトルと一致するので、共鳴波長から試料の誘電率を決定することができる。タンパク質の相互作用を検出する実験では、例えば、金属膜上に抗体を固定化し金属膜上の抗原抗体反応を起こさせる。この時の金属膜上の誘電率変化を見積もることで、抗原抗体反応の程度を見積もることが、SPRセンサーをバイオセンサーとして利用する場合の方法である。

【0004】SPRセンサーは、タンパク質の相互作用を検出する装置として広く使用され、注目を集めている。しかし、現在使用されているSPRセンサーは大型であり、また、フローインジェクション形式を採用することから、試料をin situで測定することができない。このことから、いわゆるプローブ型SPRセンサーは試料をin situで測定することができるセンサーとして有効な方法と考えられる。

【0005】しかし、SPRセンサーを用いてタンパク質相互作用を検出する場合、毎回の測定においてベースラインを決定し、その値からの変化量としてタンパク質相互作用を見積もる必要がある。すなわち目的とするタンパク質相互作用を検出するためには、測定試料の他に、ベースラインを決定するための試料が必要となる。したがって従来の測定方法に従うならば、プローブ型SPRセンサーを用いてin situの測定を行う場合においても、他の試料を用いてベースラインを決定する必要がある。これでは、プローブ型SPRセンサーの特徴であるin situ測定の有利性が減殺されてしまう。

【0006】そこで、差動式SPRセンサーを用いることが検討される。差動式SPRセンサーの本質は、同一の金属膜上に抗体を固定した面と、抗体を固定化しない面を作成し、それら両方の面で得られる共鳴波長を比較することで抗原抗体反応を見積もることである。しかし、同一の金属膜上に抗体を固定化した面と固定化しない面を作成しても、それらの面で起きる現象を独立に観測することは困難である。なぜなら、例えば抗原抗体反応によって得られる誘電率の変化は微小なため、すなわ

ち共鳴波長の変化は微小なため、それぞれの面での共鳴波長を独立に決定することが困難であるからである。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、前記不具合を解決するべく創案されたものであって、共鳴波長を独立に決定することができ、ベースラインの決定を必要としない差動式SPRセンサーを提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】かかる課題を解決するために本発明が採用した技術手段は、金属膜上に被測定物質を固定化した面と固定化していない面とを形成してなる差動式SPRセンサーであって、該金属膜に膜厚の異なる誘電体膜を複数形成し、一つの誘電体膜の表面を参照面とし、他の誘電体膜の表面を動作面として被測定物質を固定化するように構成したことを特徴とするものである。この差動式SPRセンサーは、プローブ型SPRセンサーのみならず、いわゆるフローインジェクション型SPRセンサーにも適用することができるが、以下の理由から、特にプローブ型SPRセンサーにおいて有利に採用される。

【0009】差動式SPRセンサーは、①ベースラインの決定を必要としない、②非特異的吸着による測定精度の低下を抑えることができる、③温度変化による測定精度の低下を抑えることができる、という利点を有する。ここで利点②③については、差動式以外の方法でも実現することができる。②については測定試料中に非特異的結合を抑制する薬品を加える、③については温度制御をする等で達成できる。しかしながら、プローブ型の場合は、センサーを試料（例えば海や体内の組織等）に浸すことで測定を完了させることが狙いなので、前記解決方法を採用することはできず、したがって、プローブ型センサーにとって差動式の方法は有用な手段となる。また利点①については、フローインジェクション型の場合には、一般的に実験室で十分な時間をかけて実験ができる場合が多く、また、流路の変更も容易であるため、差動式の方法はさほど大きなメリットを有しない。これに対して、測定の簡便性、迅速性が要求されるプローブ型において差動式はとりわけ有用である。

【0010】金属膜上に誘電体層を形成する構成についても、特にプローブ型にとって有用である。フローインジェクションに差動式を用いる場合には、抗体を固定化した面と固定化していない面をある程度の距離を離して同一の金属膜上に形成させれば差動式の方法を実現することができる。この場合、誘電体層は必ずしも必要ではなく、異なる厚みの誘電体層を用いた場合には、前述の「ある程度の距離を離して」という作業を省くことができるという効果を有するに留まる。これに対して、プローブ型の場合は、「ある程度の距離を離して」という作業で抗体を固定化した面と固定化しない面とを作製しても、それらを独立に観測することはできない。したがっ

て、プローブ型においては、膜厚の異なる誘電体を設けることが必須の構成要素となる。

【0011】プローブ型SPRセンサーは、光源と、センサープローブと、光検出手段とを有し、該プローブは、センサー面を備えた金属膜と、反射面とを有しており、該プローブの基端側は光の入出端部を構成しており、該光源は該プローブの基端側に光学的に連結されており、該光検出手段は該金属膜及び該反射面を介して該プローブの基端側から出射された光を受光するように構成されている。プローブ型センサー自体は公知であり、例えば図7、図8に示すような従来のプローブ型センサーの構成を本発明に採用することもできる。

【0012】しかしながら、本出願人が鋭意研究したところによると、該センサー面と該反射面とをプローブの長さ方向に対して傾斜状に延出する傾斜面に形成し、これらを互いに直角に会合するように構成することで、従来のプローブ型センサーに比べて、測定感度が良好なプローブ型SPRセンサーを提供できることがわかった。このようなプローブ型センサーにおいて、センサー面に対する光の入射角は好ましくは60度から80度の間である。

【0013】また、本発明が採用した測定法は、金属膜上に被測定物質を固定化した面と固定化していない面とを形成してなる差動式SPRセンサーであって、該金属膜に膜厚の異なる誘電体膜を複数形成し、一つの誘電体膜の表面を参照面とし、他の誘電体膜の表面を動作面として被測定物質を固定化してなる差動式SPRセンサーを用いた測定法であって、該動作面における測定結果と該参照面における測定結果とを比較することで測定物質を測定することを特徴とするものである。

【0014】従来の測定法を代表的な用途である抗原の測定を例にとると以下のとおりである。抗原と特異的に反応する抗体がセンサー表面に固定化される。最初に、抗原を含まない緩衝液の共振角を測定する。次に抗原を含む緩衝液で一定時間満たして抗原抗体反応を生じさせる。反応後、抗原を含まない緩衝液でセンサー表面を洗浄し、反応後の共振角を測定する。そして、抗原抗体反応の前後での共振角の差を求め、それを抗原濃度に換算する。これに対して、本発明に係る測定法では、抗原を含む緩衝液を動作面および参照面で測定して比較することで、抗体濃度を算出するようにしたものである。

【0015】本発明に係るSPRセンサーは好適には抗原抗体反応の検出に用いられるが、本発明のSPRセンサーは抗原抗体反応の測定に限定されるものではなく、相互作用の様子が「結合」という場合に広く適用することができ、例えば、核酸あるいは核酸アナログのハイブリダイゼーション、核酸とタンパク質の相互作用、レセプターとリガンドの結合、糖鎖同士の相互作用等に用いることもできる。センサー面に固定化される被測定物質についても、測定物質に応じて抗体以外の物質が固定化

される。金属膜に付着させる誘電体層については、実施の形態ではプラズマ重合膜を用いたが、膜形成手段はこれに限定されるものではなく、他の公知の薄膜形成手段を適宜採用することができる。誘電体層は実施の形態ではHMDS膜であるが、他の誘電体層を用いてもよい。以下に述べる実施の形態では、膜厚の異なる誘電体膜を二つ形成することで動作面、参照面を構成しているが、例えば、膜厚の異なる三つの誘電体膜を設け、二つにそれぞれ異なる抗体を固定化し、他の一つを参照面として、同時に二つの物質を測定することもできる。

【0016】

【発明の実施の形態】差動式SPRセンサーについて図2に基づいて説明する。図2(a)の模式図は、同一の金属膜上に膜厚の異なる誘電体層を形成させ、その一方の面に抗体を固定化することを示している。この場合に得られる信号は図2(b)に示すように、誘電体層の厚い面と誘電体層の薄い面それぞれからの二つの共鳴波長である。すなわち、それぞれの面の誘電体層の厚さに依存する共鳴波長を得ることで、それぞれの共鳴波長変化分を明確に観測することができる。

【0017】センサープローブの構成について図3に基づいて説明する。図3は本発明に係るセンサープローブの基本的構成を示すもので、特に差動式に限定するものではない。センサープローブは長尺状の本体を有し、先端側(図では下端側)には、センサー面を備えた金属膜と、反射鏡(反射面)とが形成されており、一方該プローブの基端側(図では上端側)は光の入出端部を構成している。該センサー面と該反射面とはプローブの長さ方向に対して傾斜状に延出する傾斜面に形成されていると共に、互いに直角に会合するように構成されている。センサープローブは図のものでは上から平行光線が入射される。センサー面は光路に対して直交する面に対して68度の角度で傾斜状に延出しており、上端面から入射した光はセンサー面に入射角68度で入射するように設計されている。反射面は光路に対して直交する面に対して22度の角度で傾斜状に延出している。センサー面で反射した光は反射面によって反射され、上端面に出射するように設計されている。このセンサーでは、初めに反射面で反射した後にセンサー面に入射角68度で入射する光路も考えられるが、それぞれの光路で得られるSPR信号は同じである。センサー面に対する光の入射角は68度に限定されるものではなく、好ましくは60度から80度の間の入射角を適宜選択することが可能である。

【0018】センサープローブのセンサー面は、金を膜厚52nm、クロムを2nmスパッタリングすることによって作製してある。反射面はクロムを約100nmスパッタリングすることで作製した。センサープローブはBK7ガラスを使用してある。センサープローブの直径は3mm、長さは15mmである。尚、図7、図8は公知のプローブ型SPRセンサーを示す図であって、本発

明に係る差動式の方式はこれらの公知のプローブ型SPRセンサーに適用することも可能である。

【0019】図4に差動式SPRセンサーのセンサープローブの拡大図を示す。センサー面の左右それぞれに膜厚の異なる誘電体層を形成させて差動式のセンサープローブを構成する。センサー面は金属膜上に膜厚の異なるプラズマ重合膜を形成して差動式SPRセンサーを構成する。誘電体層はHexamethyldisiloxane(HMDS)をプラズマ重合することで作製した。HMDSプラズマ重合膜は金属膜上に強固に形成され、また疎水性であることから、非特異的なタンパク質の吸着を妨げる。プラズマ重合膜の厚さは、それぞれの共鳴波長が十分離れるために必要な厚さとして、それぞれ1nm、34nmとした。プラズマ重合は、ベルジャー内の真空度1.3Paとした後、monomerガスを40Pa導入し、RF発振器によってmonomerガスをプラズマとする。実施例では、Hexamethyldisiloxane(HMDS)(信越シリコン)をmonomerガスとして用い、重合時間は参照面5秒間、動作面150秒間であり、発振出力はいずれの場合も150Wである。

【0020】図4において、センサー面(a)で示した面には膜厚の薄いプラズマ重合膜のみを形成した。センサー面(b)で示した面には膜厚の厚いプラズマ重合膜を形成し、プラズマ重合膜上にウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumin:BSA)を固定化した。本明細書では、誘電体層が薄い面でBSAが固定化されていない面を参照面、誘電体層が厚くBSAが固定化されている面を動作面という。もちろん、誘電体層の膜厚が薄い方にBSAを固定化して動作面としてもよい。センサープローブへの抗体の固定化については、リン酸緩衝液に10g/lのウシ血清アルブミンを混合した液体にセンサープローブを約8時間浸すことで、ウシ血清アルブミンをセンサープローブへ固定化した。この際、センサープローブの参照面には粘着テープを貼り、BSAが参照面に固定されるのを防止した。

【0021】図5に基づいてセンサープローブの固定について説明する。図5では筒状の固定部材に対して右側からセンサープローブを挿入するように記載してあり、該固定部材には左側から光ファイバーを挿入するようになっている。光ファイバーのコアの直径は200μmであり、開口数は0.39である。光ファイバーからの光を平行光線とするために、本実施例では平凸レンズを用いた。用いた平凸レンズの直径は4mmであり、焦点距離は4mmである。また、このレンズはセンサープローブからの反射光線を、光ファイバー端面に焦点を持つ集光光線あるいは収束光線とする働きも担っている。

【0022】図6に基づいてプローブ型SPRセンサーの全体構成について説明する。50Wのハロゲンランプ(光源)からの光をレンズと鏡を用いて平行光線とす

る。平行光線は、ビームスプリッターを通してレンズによって光ファイバーに導かれる。図中の光ファイバーの端面には、センサープローブとセンサープローブの固定部材が接続されている。センサープローブからの反射光はビームスプリッターと光ファイバーを通して、分光器に導かれる。分光器からの光はCCDによって検出され、コンピュータによって共鳴波長が読み取られる。

【0023】図9に差動式SPRセンサープローブで得られた反射光強度と波長の関係を示す。図から二つの共鳴波長が確認できる。これらはそれぞれ、プラズマ重合膜が厚くBSAが固定化されている面での共鳴波長と、プラズマ重合膜が薄くBSAが固定化されていない面での共鳴波長を示している。ここでは、プラズマ重合膜が厚くかつBSAが固定化されている面を動作面、プラズマ重合膜が薄くBSAが固定化されていない面を参照面と呼ぶ。

【0024】図10に差動式SPRセンサーで抗原抗体反応を測定した結果の一例を示す。図では動作面で得られた結果と、参照面で得られた結果とを併せて示した。両者の結果において(a)の領域で抗体を含まない緩衝液を10分間測定し、(b)の領域で抗体を含む緩衝液を20分間測定する。再び(c)の領域で抗体を含まない緩衝液を10分間測定する。

【0025】図10から、動作面で得られた結果では(b)の領域において、抗原抗体反応による共鳴波長の増加が観測されていることが判る。一方で、参照面での領域(b)では、試料全体の誘電率変化のみに依存する変化しか確認できない。一般的なSPRセンサーでは、図10の動作面での信号における領域(a)と(c)の共鳴波長を比較することで、抗体の結果量を定量する。

【0026】図11に図10における動作面で得られた共鳴波長と参照面で得られた信号の時間変化を示した。図11においても、図10の動作面から得られた結果と同様に、領域(b)における共鳴波長の増加が確認できる。この場合、抗体の結合量は領域(b)の開始時刻の共鳴波長と領域(b)の終止時刻の共鳴波長の変化分で特徴付けられると考えられる。この方法に従い抗体濃度算出する場合、領域(a)及び(c)に示される測

定は不要である。

【0027】図12に一般的な方法で得られた抗体濃度に対する検量線と差動式を用いた場合の検量線を併せて示した。図12の結果から両者の方法に基づく抗体濃度の算出方法には大きな相違はないと判断できる。以上の考察から、差動式のプローブ型SPRセンサーを用いた場合、測定試料のみを必要とする測定が可能となる。また、測定試料中に様々な物質が存在する場合、それらの物質が非特異的に金属膜へ結合し測定制度の低下となることが予想できる。しかし、差動式プローブ型SPRセンサーの場合、動作面の信号から参照面の信号を引いた値を有効な値とするので、それら非特異的な結合に共鳴波長変化は相殺されると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】(a)はSPRセンサーの原理図、(b)は観測される信号である。

【図2】(a)は差動式SPRセンサーの原理図、(b)は差動式SPRセンサーで観測される信号である。

【図3】プローブ型SPRセンサーの正面図、側面図および端面図である。

【図4】センサー面を示すセンサープローブの拡大図である。

【図5】ローブ型SPRセンサーの固定部分の概略図である。

【図6】プローブ型SPRセンサーの全体図である。

【図7】公知のプローブ型SPRセンサー(Jorgenson et. al. 1991)の模式図である。

【図8】公知のプローブ型SPRセンサー(Chail et. al 1997)の模式図である。

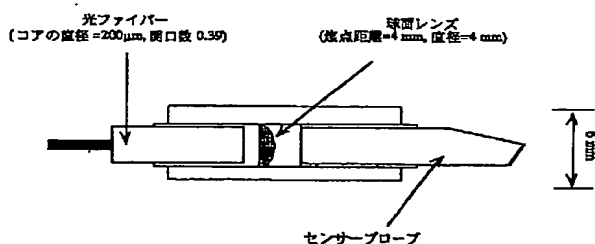
【図9】差動式プローブ型SPRセンサーで得られた反射光強度と波長の関係を示す図である。

【図10】動作面と参照面それぞれで得られる結果を示す図である。

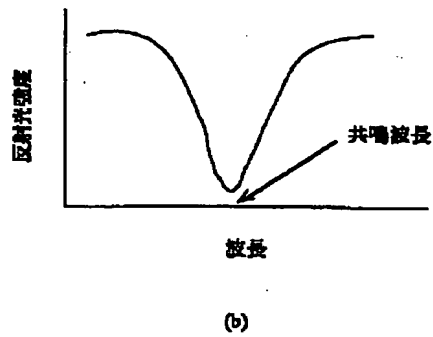
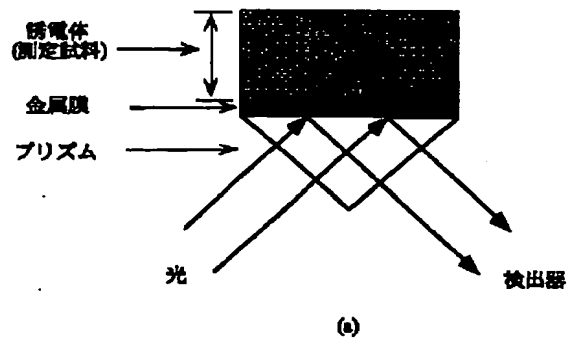
【図11】差動式で得られる結果を示す図である。

【図12】差動式と一般的な方法を用いた場合に得られるBSA抗体濃度に対する検量線を表す図である。

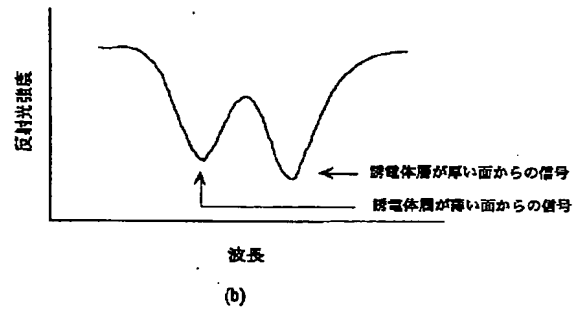
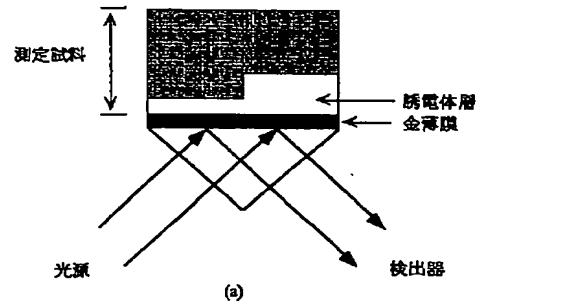
【図5】



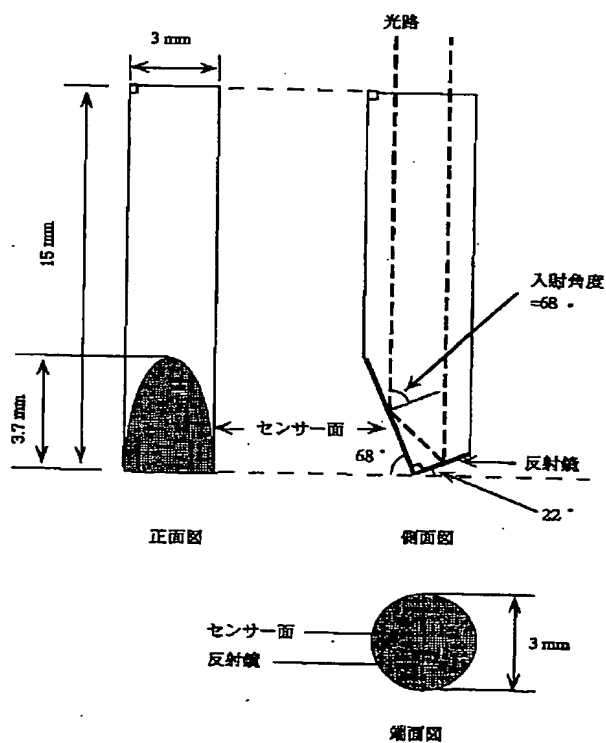
【図1】



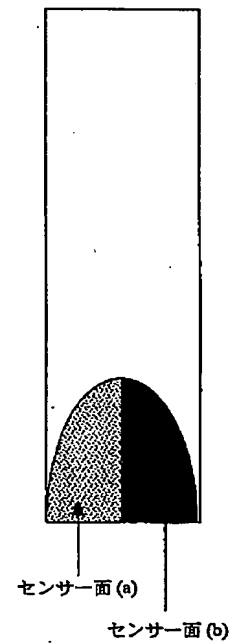
【図2】



【図3】



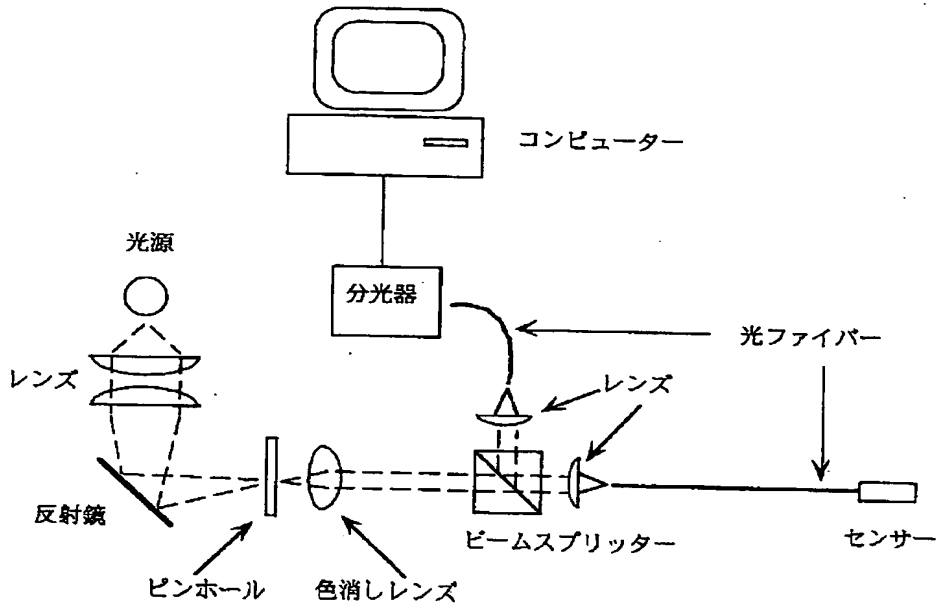
【図4】



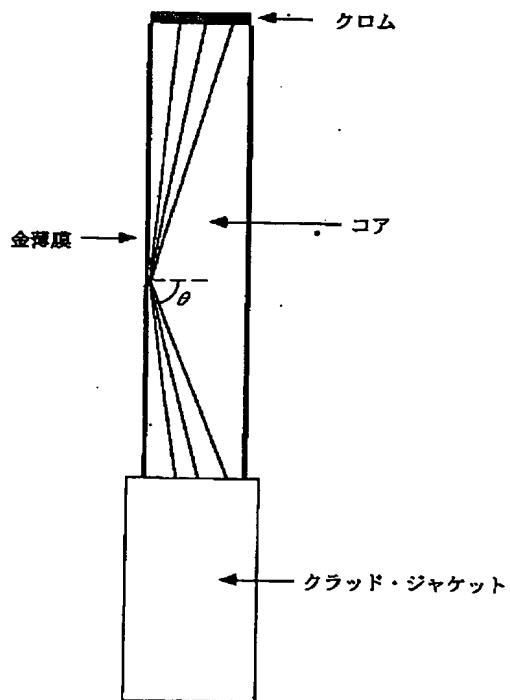
センサー面 (a) : 誘電体層の膜厚が薄い。

センサー面 (b) : 誘電体層の膜厚が厚い。ウシ血清アルブミン固定。

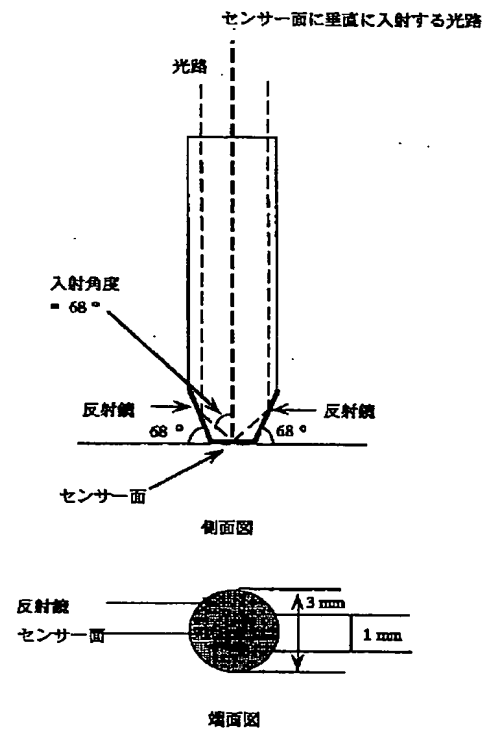
【図6】



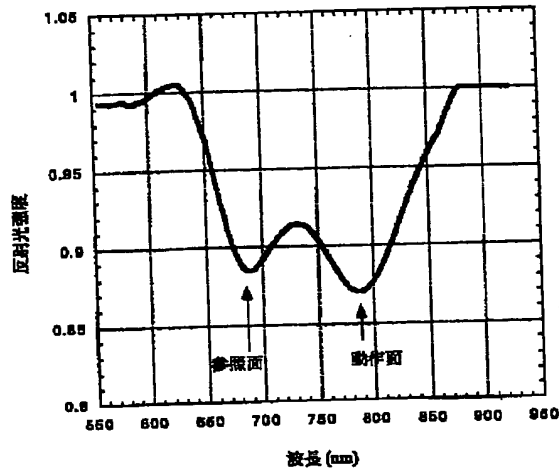
【図7】



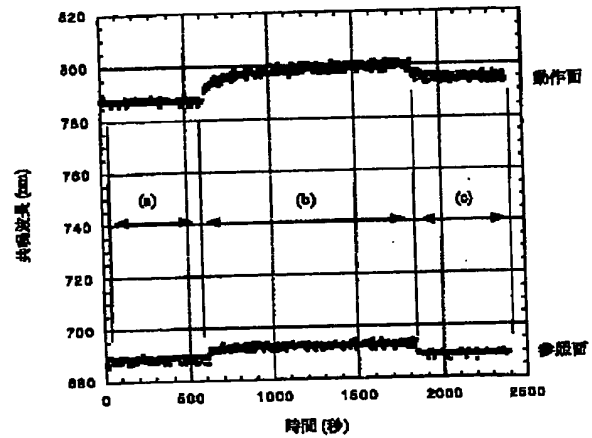
【図8】



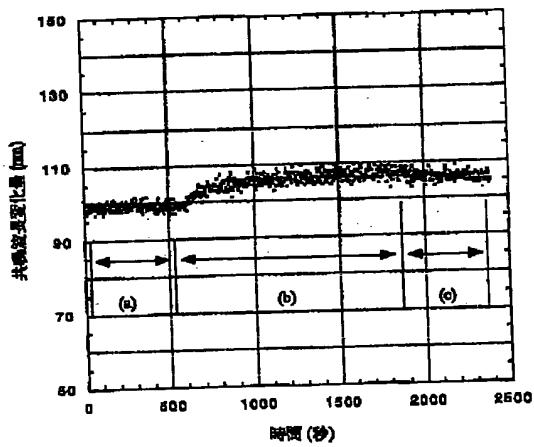
【図9】



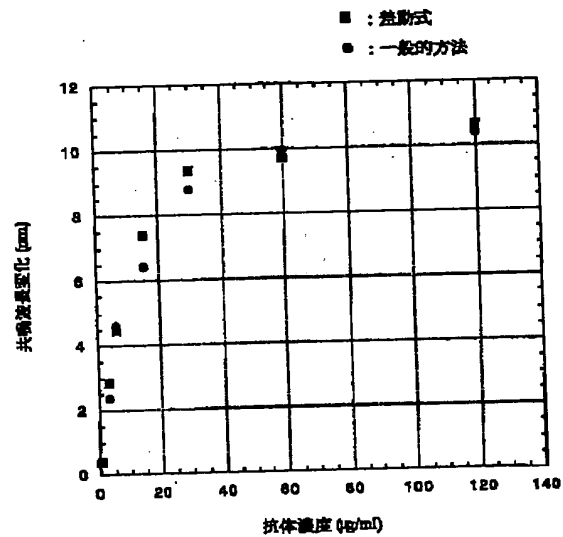
【図10】



【図11】



【図12】



フロントページの続き

(72)発明者 秋元 卓央
東京都新宿区西落合3-24-20

Fターム(参考) 2G059 AA01 AA05 BB12 CC16 EE02
FF04 GG10 JJ11 JJ13 JJ17
JJ22 KK04 MM12
5F089 BA05 BB01 BB09 BC07 BC17
GA07